

BAB IV

HASIL & PEMBAHASAN

4.1. Hasil

Penelitian ini menggunakan sampel bahan biologi tersimpan berupa 19 organ ginjal kiri dari penelitian Lusiantari *et al.* (data belum dipublikasikan) dengan judul Pengaruh Probiotik Terhadap Ekspresi Reseptor Endhotelin-B dan Kadar Malondialdehid (MDA) Otak Pada Tikus Model Hiperkolesterolemia yang Diinduksi Mentega Putih. Pengajuan kaji etik telah disetujui dengan nomor 43/Ka.Kom.Et/70/KE/VII/2019. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar malondialdehid (MDA) ginjal tikus Wistar jantan yang telah diinduksi mentega putih setelah pemberian probiotik dengan dosis $1,65 \times 10^6$ cfu bakteri/gram, $5,5 \times 10^6$ cfu bakteri/gram dan $1,65 \times 10^7$ cfu bakteri/gram. Sebanyak 19 organ ginjal yang didapat dari tikus Wistar jantan berusia kurang lebih dua bulan dengan berat 150-200 gram. Tikus tersebut dibagi menjadi 5 kelompok yaitu C(-), C(+), T1, T2, dan T3. Metode yang digunakan untuk mengukur kadar MDA menggunakan metode thiobarbiturik dengan prinsip spektrofotometri.

Setelah dilakukan pengukuran, didapatkan kelompok kontrol negatif (C(-)) memiliki rerata kadar MDA paling rendah dibandingkan dengan kelompok yang lain. Kelompok yang memiliki kadar MDA tertinggi adalah kelompok kontrol positif (C(+)). Sedangkan kelompok T1, T2 dan T3 secara berurutan menunjukkan urutan dari tinggi hingga rendah. Kadar kelompok T1 masih lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif (C(+))

Tabel 4. Rerata pengukuran kadar MDA ginjal tikus Wistar jantan

Kelompok	n	Rerata \pm SD (nmol/gram)
C (-)	4	$1,32 \pm 0,13$
C (+)	4	$4,71 \pm 0,31$
T1	3	$3,52 \pm 0,08$
T2	4	$2,90 \pm 0,12$
T3	4	$1,72 \pm 0,10$

Analisis statistik kadar *Malondialdehid* (MDA) ginjal diawali dengan Uji *Saphiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data. Hasil dari uji tersebut didapatkan nilai $p > 0,05$ pada kelompok C(-), C(+), T2 dan T3, sedangkan pada kelompok T1 didapatkan nilai $p < 0,05$. Oleh karena itu, syarat pengujian *One Way Anova* tidak terpenuhi sehingga dilakukan uji *Kruskal-Walis* sebagai uji alternatif dari uji *One Way Anova*. Pada uji *Kruskal-Wallis* sebagai uji alternatif dari uji *One Way Anova* didapatkan nilai p sebesar 0,002. Nilai tersebut menunjukkan bahwa perlakuan yang dilakukan selama penelitian memberikan pengaruh yang bermakna terhadap nilai uji, atau dapat dikatakan pemberian probiotik dapat memberikan mempengaruhi kadar MDA yang cukup bermakna. Selanjutnya dilakukan uji *Post hoc Mann Whitney* antar kelompoknya untuk mengetahui dimanakah kadar yang paling bermakna diantara kelompok tersebut. Setelah dilakukan uji *Post hoc Mann-Whitney* didapatkan hasil seperti yang tercantum pada tabel 7 dibawah ini.

Tabel 5. Hasil Analisis *Post hoc Mann-Whitney* Antar Kelompok

Kelompok Perlakuan	Nilai p
C- vs C+	0,020
C- vs T1	0,031
C- vs T2	0,020
C- vs T3	0,019
C+ vs T1	0,032
C+ vs T2	0,021
C+ vs T3	0,020
T1 vs T2	0,032
T1 vs T3	0,031
T2 vs T3	0,020

Keterangan:

C(-) : Kelompok kontrol negatif (tidak diberikan intervensi)

C(+): Kelompok kontrol positif (diinduksi mentega putih)

T1 : Kelompok intervensi probiotik dosis rendah ($1,65 \times 10^6$ cfu bakteri/gram)

T2 : Kelompok intervensi probiotik dosis tengah ($5,5 \times 10^6$ cfu bakteri/gram)

T3 : Kelompok intervensi probiotik dosis tinggi ($1,65 \times 10^7$ cfu bakteri/gram)

4.2. Pembahasan

Dalam penelitian ini didapatkan hasil adanya kadar MDA yang lebih tinggi pada kelompok tikus yang mendapatkan induksi mentega putih. Induksi mentega putih dalam penelitian ini dipilih untuk mencetuskan kondisi hiperkolesterolemia. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Nurmasitoh dan Pramaningtyas (2015). Dalam penelitian tersebut pemberian mentega putih yang dilakukan selama 14 hari dalam dosis 4mg dalam 20 mg pakan standar juga terbukti dapat mencetuskan kondisi hiperkolesterolemia (Nurmasitoh dan Pramaningtyas, 2015). Selain itu, menurut penelitian yang dilakukan oleh Meng *et al.* (2016) tikus wistar yang diinduksi diet tinggi kolesterol berupa 2% kolesterol, 0,5% natrium kolat, 0,2% propiltiourasil, 10% lemak babi, 55 gula putih dan 82,3% pakan standar selama 10 minggu menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA dalam serum dan aorta (Meng *et al.*, 2016). Mentega putih terdiri dari lemak 100%, sehingga penggunaan mentega putih ini dapat meningkatkan kadar kolesterol dalam darah (Sari *et al.*, 2015). Peningkatan kadar kolesterol total juga diikuti dengan peningkatan kadar MDA plasma (Hariaji, 2019).

Keadaan hiperkolesterolemia ini dapat berhubungan dengan tingginya kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan menurunnya *High Density Lipoprotein* (HDL). Kadar LDL yang tinggi dapat memicu terbentuknya radikal bebas (Smart *et al.*, 2011). Selain itu, keadaan stres oksidatif biasanya terjadi bila jumlah radikal bebas lebih tinggi dibandingkan jumlah antioksidan dalam tubuh. Stres oksidatif tubuh dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameternya, yaitu kadar malondialdehid (MDA) (Valko, 2006). Tingginya kadar MDA disebabkan oleh ketidakseimbangan jumlah antioksidan, baik yang berupa enzim endogen maupun antioksidan dari diet dengan jumlah pro-oksidan dan dapat menyebabkan kondisi stres oksidatif (Setiawan *et al.*, 2016). Semakin tinggi kadar MDA maka semakin tinggi stress oksidatif yang terjadi dalam sel-sel tubuh (Valko, 2006). Hal tersebut dikarenakan radikal bebas yang meningkat dapat mendegradasi lemak tak jenuh ganda

membentuk MDA dan mengakibatkan komplikasi lainnya (Setiawan *et al.*, 2016).

Pengukuran MDA telah lama digunakan sebagai indikator kerusakan oksidatif pada lemak tak jenuh sekaligus sebagai indikator keberadaan radikal bebas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa subjek pada manusia dengan diet tinggi lemak akan mengalami kondisi stres oksidatif yang ditandai oleh radikal bebas yang meningkat dan status kapasitas enzim antioksidan menurun (Setiawan *et al.*, 2016). Enzim antioksidan yang menurun tersebut seperti *glutathione peroxidase* (GPX), *catalase* (CAT) dan *superoxide dismutase* (SOD) sehingga stres oksidatif akan berlangsung terus menerus. Enzim antioksidan dalam tubuh ini berfungsi untuk melawan radikal bebas untuk melawan efek yang berupa perusakan biomolekular jaringan tubuh. Enzim antioksidan ini sendiri terdapat beberapa lini. Senyawa seperti GPX, CAT dan SOD merupakan enzim antioksidan lini pertama yang sangat diperlukan dalam seluruh pertahanan kerusakan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas (Ighodaro&Akinloye, 2017).

Ketika dalam tubuh mengalami peningkatan kadar kolesterol, maka tubuh akan memicu proses pengeluaran lemak agar kadar kolesterol kembali menjadi normal. Pengeluaran lemak dari dalam tubuh dilakukan dengan cara mengubah kolesterol menjadi asam empedu oleh sel hepatosit perisentral. Mekanisme dari pembentukan asam empedu adalah dengan mengubah kolesterol menjadi 7-(alfa)-hidroksikolesterol dengan bantuan enzim 7-(alfa)-hidrosilase oleh sitokrom P-450. Senyawa 7-(alfa)-hidroksikolesterol merupakan senyawa oksisterol yang akan mengaktivasi *Liver X Receptor* (LXR) (Parikh *et al.*, 2014). Senyawa LXR yang teraktivasi oleh oksisterol akan mengekspresikan CYP7AI untuk mengubah 7-(alfa)-hidroksikolesterol menjadi asam empedu bentuk asam kolat dan asam kenokolat. Ketika senyawa CYP7AI meningkat maka akan meningkatkan konsumsi oksigen dan NADPH yang memiliki efek meningkatkan radikal bebas superoksida (O_2^-) (Muriel, 2009). Nantinya asam kolat dan asam kenokolat yang terbentuk

akan berkonjugasi dengan taurin dan glisin membentuk garam empedu terkonjugasi. Garam empedu terkonjugasi ini akan kembali ke dalam tubuh melalui siklus enterohepatik, sehingga kondisi hiperkolesterolemia akan tetap terjadi. Kondisi hiperkolesterolemia tersebut akan semakin meningkatkan radikal bebas (Wresdiyati *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini, kelompok C(-) memiliki rata-rata kadar MDA ginjal terendah dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini disebabkan karena tidak adanya induksi hiperkolesterolemia, sehingga radikal bebas yang terbentuk juga tidak banyak. Sedangkan pada kelompok C(+) didapatkan rata-rata kadar MDA ginjal tertinggi. Keadaan ini disebabkan oleh tinggi asupan kolesterol tanpa adanya intervensi apapun yang dapat membantu menurunkan kadar kolesterol. Hal ini mengakibatkan banyaknya radikal bebas yang terakumulasi dalam tubuh, sehingga kadar MDA akan meningkat (Ighodaro & Akinloye, 2017).

Peningkatan kadar MDA tersebut dikemukakan oleh Prasad *et al.*, (2012) dalam penelitiannya bahwa induksi hiperkolesterolemia pada kelinci dapat meningkatkan kadar MDA. Induksi hiperkolesterolemia pada penelitian tersebut dilakukan secara bertahap, dimana didapatkan hasil bahwa semakin lama induksi maka kadar MDA semakin tinggi (Prasad *et al.*, 2012). Penelitian lain oleh Yang *et al.*. (2012) mengungkapkan bahwa induksi hiperkolesterolemia menggunakan 4% kolesterol dan 1% asam kolat dapat selama 8 minggu meningkatkan kadar MDA. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa hiperkolesterolemia jangka panjang merupakan salah satu faktor risiko terjadinya gagal ginjal yang diinduksi kontras. Hal tersebut dikarenakan gangguan prostaglandin intra-renal dan kelainan dalam sistem oksida nitrat ginjal yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Dimana peroksidasi lipid dapat dinilai dengan peningkatan kadar MDA (Yang *et al.*, 2012).

Yustika *et al.* (2013) melakukan penelitian terhadap tingginya kadar MDA pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) pasca induksi *Cylosporin-A* (CsA). Senyawa CsA merupakan kelompok obat yang

berfungsi menekan respon imun, akan tetapi penggunaan jangka panjang dapat menimbulkan efek nefrotoksisitas. Sehingga pada penelitian tersebut, MDA berfungsi untuk menilai setinggi apa kadar radikal bebas yang ada terjadi pada ginjal tersebut. *Reactive oxygen species* (ROS) merupakan bagian dari radikal bebas dimana ROS dapat mengakibatkan fibrosis pada sel-sel epitel organ ginjal. Fibrosis ginjal terjadi karena inflamasi pada epitel tubulus dan glomerulus (Yustika *et al.*, 2013).

Penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis probiotik yang diberikan pada tikus maka kadar MDA pada tikus akan semakin rendah. Hal tersebut ditunjukkan dengan hasil MDA pada kelompok perlakuan T1, T2 dan T3 dimana secara berurutan menunjukkan hasil yang semakin rendah. Selain itu, pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa pemberian probiotik sebesar $1,65 \times 10^7$ cfu bakteri/gram (kelompok T3) dapat menurunkan kadar MDA sebesar 63,48% ketika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Utami *et al.* (2017) dimana pemberian probiotik yang berisi bakteri *Lactobacillus casei* strain Shirota sebanyak 1,5 mL/hari selama 21 hari dapat menurunkan kadar MDA serum darah sebanyak 60,15% (Utami *et al.*, 2017).

Selain melalui mekanisme penurunan MDA, probiotik juga dapat memperbaiki fungsi ginjal melalui mekanisme penurunan inflamasi. Menurut Pei *et al.* (2018) probiotik, prebiotik dan sinbiotik dapat menurunkan inflamasi yang terjadi pada gangguan ginjal. Sehingga dapat meningkatkan fungsi ginjal dengan cara mengembalikan simbiosis mikroflora yang terdapat pada usus pasien dengan gangguan ginjal (Pei *et al.*, 2018).

Penelitian serupa dengan penelitian ini juga dilakukan oleh Kim (2017) dengan pemberian dosis probiotik yang sama dan dilakukan selama 8 minggu, menunjukkan terjadi penurunan angka total kolesterol, triasilgliserol dan angka LDL secara signifikan. Penelitian lain oleh Mazloom *et al.* (2013) menunjukkan bahwa penggunaan probiotik sebesar 3000mg per hari selama 6 minggu pada pasien diabetes mellitus

tipe 2 dapat menurunkan kadar MDA. Penelitian oleh Zhang *et al.* (2010) bahwa induksi tikus hiperlipidemia selama 2 minggu untuk mengetahui potensi dari *Lactobacillus casei* sebagai antioksidan, pemberian dilakukan setelah induksi hiperlipidemia pada tikus dengan menilai kadar MDA, SOD (superoxide dismutase) dan GDH-Px (Glutathione peroxidase) pada plasma tikus. Didapatkan hasil berupa pemberian bakteri sejumlah 2×10^9 CFU/hari tidak memberikan hasil signifikan sebagai antioksidan. Pada kelompok perlakuan didapatkan bahwa semakin banyak pemberian probiotik, maka kadar MDA akan semakin rendah (Zhang *et al.*, 2010).

Penelitian milik Riyanto dan Muwarni (2015) dimana penelitian tersebut untuk mengetahui kadar LDL setelah pemberian yogurt kedelai hitam. Yogurt kedelai hitam atau dikenal juga dengan *black soyghurt* yang digunakan merupakan *yogurt* berbahan dasar susu kedelai hitam lokal dengan jumlah bakteri 10^{7-8} CFU/mL. Bakteri yang terkandung dalam *black soygurt* adalah *Lactobacillus casei* dan *Streptococcus thermophilus* (Riyanto dan Muwarni, 2015).

Mekanisme penurunan kolesterol oleh bakteri diantaranya melalui mekanisme asimilasi kolesterol, dekonjugasi asam empedu dan transformasi kolesterol menjadi koprostanol. Asimilasi kolesterol terjadi melalui mekanisme pengambilan kolesterol oleh bakteri asam laktat yang kemudian kolesterol tersebut akan berinkoperasi dengan membran sel bakteri sehingga menyebabkan berkurangnya jumlah kolesterol bebas yang ada dalam tubuh (St-Onge *et al.*, 2000). Bakteri asam laktat yang digunakan adalah galur-galur dari spesies *L.acidophilus*, *L.gaseri*, *L. plantarum*, *L.sake*, *Streptococcus sp.*, dan *Enterococcus sp.* Dimana bakteri-bakteri tersebut ketika diuji mempunyai aktivitas asimilasi kolesterol dengan derajat yang bervariasi dengan kisaran antara 8,2-83,3 microgram/mL (Winarti, 2011). Bakteri asam laktat juga mampu mensekresikan enzim BSH dimana nantinya enzim tersebut dapat memisahkan glisin atau taurin dari garam empedu terkonjugasi. Ketika glisin atau taurin terpisah maka garam empedu akan terdekonjugasi,

sehingga garam empedu akan kesulitan untuk kembali ke dalam siklus enterohepatik. Hal tersebut mengakibatkan gram empedu akan lebih banyak diekskresikan melalui feses. Kondisi ini akan berakibat kebutuhan kolesterol dalam tubuh meningkat, dimana selanjutnya kadar kolesterol dalam darah akan berkurang (St-Onge *et al.*, 2000).

Mekanisme utama yang berperan dalam menurunkan MDA dalam penelitian ini adalah asimilasi kolesterol. Hal tersebut dapat terjadi karena pemberian probiotik tepat dilakukan setelah induksi mentega putih. Sehingga ketika diet tinggi kolesterol masuk ke dalam saluran pencernaan maka kolesterol tersebut akan diasimilasi oleh probiotik. Hal itu dapat menghambat penyerapan kolesterol menuju pembuluh darah. Ketika kadar kolesterol dalam darah turun maka selanjutnya kadar MDA juga akan menurun. Penelitian milik Tomaro-Duchesneau (2014) mengungkapkan bahwa seluruh strain bakteri *Lactobacillus* yang digunakan dalam penelitian itu dapat mengasimilasi kolesterol (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014). Menurut penelitian Iranmanesh (2014) probiotik dengan strain *Lactobacillus* yang mati dalam media MRS dapat menurunkan kadar kolesterol dalam media tersebut (Iranmanesh *et al.*, 2014). Mekanisme yang mungkin terjadi adalah asimilasi kolesterol dari media ke dalam sel yang mati. Hal tersebut juga didukung oleh Castorena-alba (2018), dalam penelitiannya yang menyebutkan bahwa beberapa strain probiotik memiliki kemampuan untuk mengabsorpsi kolesterol dalam media kultur dengan berbagai mekanisme. Diduga berbagai mekanisme yang terjadi dalam media tersebut juga terjadi dalam saluran pencernaan manusia untuk menurunkan kadar kolesterol, sehingga dapat membantu mengontrol kadar kolesterol plasma (Castorena-Alba *et al.*, 2018).

4.3. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan sebagai berikut:

1. Jumlah sampel dalam penelitian cukup kecil
2. Penelitian ini hanya menunjukkan pengaruh antara pemberian probiotik dan kadar MDA ginjal tikus Wistar jantan, sedangkan tidak

dilakukan pengukuran secara histopatologis untuk menilai tingkat kerusakan dari nefron ginjal tikus tersebut.